

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006405

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-080703
Filing date: 19 March 2004 (19.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 26 May 2005 (26.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

27.4.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 1 9 日

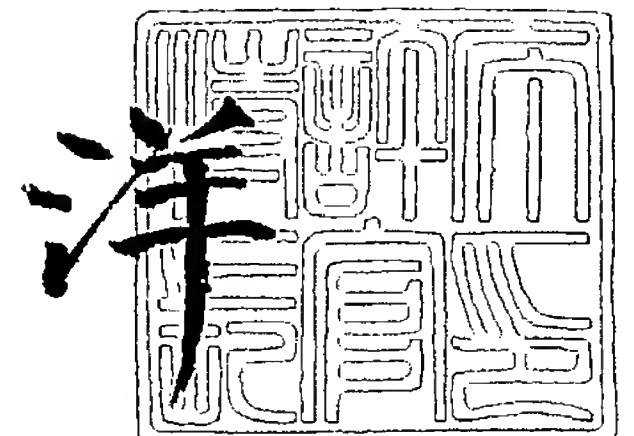
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 0 7 0 3
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 8 0 7 0 3]

出 願 人
Applicant(s): 独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構

2 0 0 5 年 3 月 2 3 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 A271P01
【提出日】 平成16年 3月19日
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 21/64

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区川内元支倉 3 5 川内住宅 1 - 5 0 1
【氏名】 寺前 紀夫

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区中山 5 - 1 8 5号棟 5 0 4
【氏名】 西沢 精一

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市泉区南光台 1 - 4 5 - 4 ハイッシャトー B 1 0 1
【氏名】 吉本 敬太郎

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市太白区萩ヶ丘 4 - 6 S W A N L A K E V 1
0 6 号
【氏名】 清野 丈博

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区山手町 2 5 - 3 0
【氏名】 佐藤 冬樹

【特許出願人】
【識別番号】 503360115
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【代理人】
【識別番号】 100067736
【弁理士】
【氏名又は名称】 小池 晃

【選任した代理人】
【識別番号】 100086335
【弁理士】
【氏名又は名称】 田村 榮一

【選任した代理人】
【識別番号】 100096677
【弁理士】
【氏名又は名称】 伊賀 誠司

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 019530
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸と、上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸とで、二本鎖核酸を形成する工程と、

上記二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプターを挿入させ、上記標的塩基と水素結合を形成させる工程と、

上記レセプターが挿入された上記二本鎖核酸の蛍光強度を測定する工程と
を有することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

【請求項 2】

上記レセプターは、複素環式芳香族基を有し、上記標的塩基との水素結合形成及び該レセプターに隣接する塩基とのスタッキング相互作用により安定化されることで、上記標的塩基と対を形成することを特徴とする請求項 1 記載の遺伝子変異検出方法。

【請求項 3】

上記レセプターは、ナフチリジン誘導体、キノリン誘導体、プテリジン誘導体、クマリン誘導体、インダゾール誘導体及びアロキサジン誘導体からなる群の少なくとも 1 つであることを特徴とする請求項 2 記載の遺伝子変異検出方法。

【請求項 4】

上記レセプターは、2-アミノ-7-メチルナフチリジンであることを特徴とする請求項 3 記載の遺伝子変異検出方法。

【請求項 5】

連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸と、

水素結合性及び発蛍光性を示し、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと

を有することを特徴とする遺伝子変異検出用キット。

【請求項 6】

水素結合性を示すレセプターが固定化された基板に、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸と、上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸とを滴下することにより、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させると共に、上記標的塩基と上記レセプターとで水素結合を形成させる工程と、

上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づいて上記標的塩基を識別する工程と
を有することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

【請求項 7】

上記レセプターは発蛍光性を示すものであり、上記レセプターが挿入された上記二本鎖核酸の蛍光強度変化に基づいて上記標的塩基を識別することを特徴とする請求項 6 記載の遺伝子変異検出方法。

【請求項 8】

上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づく表面プラズモン共鳴の信号強度変化、又は水晶振動子の共振周波数変化に基づいて上記標的塩基を識別することを特徴とする請求項 6 記載の遺伝子変異検出方法。

【請求項 9】

連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸と、

水素結合性を示し、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと、

上記レセプターが固定化された基板と

を有することを特徴とする遺伝子変異検出用キット。

【請求項 10】

連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸のうち一方の検出用核酸が固定化された基板に、上記標的核酸と、他方の検出用核酸と、水素結合性を示すレセプターとを滴下することにより、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させると共に、上記標的塩基と上記レセプターとで水素結合を形成させる工程と、

上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づいて上記標的塩基を識別する工程とを有することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

【請求項 1 1】

上記レセプターは発蛍光性を示すものであり、上記レセプターが挿入された上記二本鎖核酸の蛍光強度変化に基づいて上記標的塩基を識別することを特徴とする請求項 1 0 記載の遺伝子変異検出方法。

【請求項 1 2】

連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸と、

水素結合性を示し、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと、

2 種類の上記検出用核酸の一方が固定化された基板とを有することを特徴とする遺伝子変異検出用キット。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キット

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、バイオインフォマティクス（生命情報科学）分野において特に有用な遺伝子変異検出方法及びその方法を用いた遺伝子変異検出用キットに関し、特に遺伝子配列における一塩基置換等を簡便且つ迅速に検出する遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ヒトゲノム配列が解読された今日の研究目標の1つは、遺伝子の同定、機能の解析、さらに遺伝子発現や機能に影響して個体差を決める遺伝子の多様性である。ここで、核酸塩基配列中の一塩基の違いから生じる遺伝子の個体差のことを一塩基変異と呼ぶ。この一塩基変異の中でも頻度の多い変異のことを一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism; SNP）と呼び、遺伝子中に点在するSNPが各種疾患と強く関連することが明らかとなっている。

【0 0 0 3】

現在、SNPを含む遺伝子変異の検出方法としては、制限酵素で切断したDNA断片をゲルにより分離した後、色素でDNA断片を染色・検出するという電気泳動法が挙げられる。この方法は汎用されているものの、分離や染色に必要な時間が長く、迅速性に欠けるという問題があった。

【0 0 0 4】

また、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップと呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板も、遺伝子変異の検出に利用され始めている。このDNAチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種多数のDNAオリゴヌクレオチド鎖やcDNA等が集積されていることから、一度に多数の遺伝子検査が可能であり、臨床検査現場等への適用が期待されている。しかしながら、核酸塩基のミスマッチ形成に由来する二本鎖DNAの安定性を原理とする手法であるため、塩基配列によってはその温度制御が困難であり、さらに放射性物質や蛍光色素を被検体自体に修飾する前処理が必要である等の問題があった。

【0 0 0 5】

さらに、被検体の増幅と検出を同時に行うリアルタイムPCR法が、核酸増幅法による一段階の迅速な定量測定 of 技術として、近年普及しつつある。しかしながら、増幅反応における複雑な温度制御、プローブの導入も含めた各遺伝子配列に適用するプライマーの設計が複雑である上に、増幅装置や条件によって結果が異なる場合も少なからずあり、再現性の面においても課題を残している。また、シグナルの経時変化を利用して検出を行うため、若干操作性に欠けるという問題があった。

【0 0 0 6】

このように、従来の遺伝子変異を検出する技術は、精密な温度制御や煩雑な被検体の前処理が必要である、或いは測定までの時間が長い等の問題があり、簡便且つ迅速に遺伝子検査を行うことが不可能であった。

【0 0 0 7】

そこで、本件発明者らは、下記非特許文献1において、一塩基置換部位を有する一本鎖の標的DNAと、この標的DNAと相補的であり、且つ一塩基置換部位に対応する対応塩基を除いて脱塩基部位（AP site）とした一本鎖の検出用DNAとで二本鎖核酸を形成させ、この二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を有するレセプター分子を添加して一塩基置換部位と水素結合を形成させ、このレセプター分子の蛍光強度変化を測定することにより、一塩基置換を効果的に検出する技術を提案している。

【0 0 0 8】

【非特許文献1】 K. Yoshimoto, S. Nishizawa, M. Minagawa and N. Teramae, "Use

of Abasic Site-Containing DNA Strands for Nucleobase Recognition in Water”
J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, pp.8982-8983

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 9】

この非特許文献 1 記載の技術は、被検体となる標的 DNA のラベル化や熱制御等の煩雑な操作が原則的に不要であるため工程数が非常に少なく、また、原理上二本鎖 DNA 自体の熱的な安定性に依存しないため、検出までの時間が非常に短時間であり、再現性にも優れている。また、UV ランプを用いた目視による確認も可能であるため、特別な設備を持たない状況下においても検出が可能である。

【0 0 1 0】

しかしながら、この非特許文献 1 記載の技術では、検出用 DNA を蛍光標識する等の化学修飾は必要ないものの、脱塩基部位という特殊な部位を導入する必要がある、これが厳密な意味では化学修飾に相当してしまうという問題があった。また、脱塩基部位を導入するため、検出用 DNA を合成する際のコストが高くなるという問題があった。

【0 0 1 1】

本発明は、このような従来の実情に鑑みて提案されたものであり、標的 DNA 及び検出用 DNA に対する化学修飾を行うことなく、簡便且つ迅速に遺伝子変異を検出する遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 2】

上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出方法は、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸と、上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸とで、二本鎖核酸を形成する工程と、上記二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプターを挿入させ、上記標的塩基と水素結合を形成させる工程と、上記レセプターが挿入された上記二本鎖核酸の蛍光強度を測定する工程とを有する。

【0 0 1 3】

また、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出用キットは、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸と、水素結合性及び発蛍光性を示し、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターとを有する。

【0 0 1 4】

このような遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットでは、標的核酸と 2 種類の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成することにより二本鎖核酸に意図的にギャップ部位を構築し、この二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプターを添加してギャップ部位にレセプターを挿入させ、標的塩基と水素結合を形成させた後、レセプターが挿入された二本鎖核酸の蛍光強度を測定することにより、標的塩基に生じた遺伝子変異を検出する。

【0 0 1 5】

なお、上記レセプターとしては、例えばナフチリジン誘導体、キノリン誘導体、プテリジン誘導体、クマリン誘導体、インダゾール誘導体、アロキサジン誘導体が使用可能である。

【0 0 1 6】

ここで、上記レセプターは、基板に固定化されていても構わない。

すなわち、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出方法は、水素結合性を示すレセプターが固定化された基板に、連続した 1 以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸と上記標的塩基を挟む 2 種類の部分配列について相補的な 2 種類の一本鎖の検出用核酸とを滴下することにより、上記標的核酸と 2 種類の上記検出用核

酸とで二本鎖核酸を形成させると共に、上記標的塩基と上記レセプターとで水素結合を形成させる工程と、上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づいて上記標的塩基を識別する工程とを有する。

【0017】

また、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出用キットは、連続した1以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸と、水素結合性を示し、上記標的核酸と2種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと、上記レセプターが固定化された基板とを有する。

【0018】

このような遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットでは、標的核酸と2種類の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成することにより二本鎖核酸に意図的にギャップ部位を構築し、水素結合性を示すレセプターが固定化された基板にこの二本鎖核酸を滴下することによりギャップ部位にレセプターを挿入させて標的塩基と水素結合を形成させた後、標的塩基とレセプターとの結合に基づいて標的塩基に生じた遺伝子変異を検出する。この場合、レセプターが発蛍光性を示すものであればレセプターが挿入された二本鎖核酸の蛍光強度変化に基づいて標的塩基を識別することができる。また、標的塩基とレセプターとの結合に基づく表面プラズモン共鳴の信号強度変化、又は水晶振動子の共振周波数変化に基づいて標的塩基を識別することも可能である。

【0019】

また、上記2種類の検出用核酸の一方は、基板に固定化されていても構わない。

すなわち、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出方法は、連続した1以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸のうち一方の検出用核酸が固定化された基板に、上記標的核酸と、他方の検出用核酸と、水素結合性を示すレセプターとを滴下することにより、上記標的核酸と2種類の上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させると共に、上記標的塩基と上記レセプターとで水素結合を形成させる工程と、上記標的塩基と上記レセプターとの結合に基づいて上記標的塩基を識別する工程とを有する。

【0020】

また、上述した目的を達成するために、本発明に係る遺伝子変異検出用キットは、連続した1以上の塩基からなる標的塩基を有する一本鎖の標的核酸における上記標的塩基を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸と、水素結合性を示し、上記標的核酸と2種類の上記検出用核酸とで形成された二本鎖核酸に挿入されて上記標的塩基と水素結合を形成するレセプターと、2種類の上記検出用核酸の一方が固定化された基板とを有する。

【0021】

このような遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットでは、2種類の検出用核酸のうち一方の検出用核酸が固定化された基板に、標的核酸と、他方の検出用核酸と、水素結合性を示すレセプターとを滴下することにより、標的核酸と2種類の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させて二本鎖核酸に意図的にギャップ部位を構築し、このギャップ部位にレセプターを挿入させて標的塩基と水素結合を形成させた後、標的塩基とレセプターとの結合に基づいて標的塩基に生じた遺伝子変異を検出する。この場合、レセプターが発蛍光性を示すものであれば、レセプターが挿入された二本鎖核酸の蛍光強度変化に基づいて標的塩基を識別することができる。

【発明の効果】

【0022】

本発明に係る遺伝子変異検出方法及び遺伝子変異検出用キットによれば、標的核酸と2種類の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成して標的塩基と対向する位置にギャップ部位を構

築し、このギャップ部位に挿入されたレセプターと標的塩基とで水素結合を形成させることにより、標的塩基に生じた一塩基置換等の遺伝子変異を効果的に検出することができる。

【0023】

また、レセプター又は2種類の検出用核酸の一方を基板上に固定化し、遺伝子変異検出用キットとして用いることで、従来の欠点を克服したハイスループットな検出が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

一般に、水素結合を利用する核酸塩基認識では、レセプター分子の水素結合様式や数を変化させることで、比較的容易に高い塩基選択性を獲得できる特徴を持つ。この際、完全水溶液中では水素結合形成に基づく認識機能の発現は期待できないため、従来の研究の多くは、クロロホルム中のような無極性溶媒環境下に限定されていたが、溶媒中の核酸が変性、沈殿する要因ともなっていた。

【0025】

そこで、本実施の形態では、図1に概念的に示すように、SNP等に関連する標的塩基11を有する一本鎖の標的核酸10を含む溶液と、標的塩基11を挟む部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸20a, 20bを含む溶液とを混合し、標的核酸10と検出用核酸20a, 20bとをハイブリダイゼーションさせることで、標的塩基11と対向する部位に意図的にギャップ部位21を構築する。そして、疎水場空間であるこのギャップ部位21に水素結合性を示すレセプター分子30を挿入し、標的塩基11と水素結合を形成させる。

【0026】

このように、疎水場空間であるギャップ部位21に水素結合性を示すレセプター分子30を挿入し、標的塩基11と水素結合を形成させることで、完全水溶液中においても効果的に核酸塩基認識を行い、標的塩基11の変異を検出することができる。

【0027】

また、標的核酸10の複数塩基を挟む部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸20a, 20bを含む溶液を用いるようにすれば、複数塩基の変異を検出することができる。この場合、例えば2塩基分をギャップ部位21とすると、このギャップ部位21には2分子のレセプター分子30が挿入される。

【0028】

ここで、本実施の形態で分析可能な標的核酸10としては、例えばヒトを含む哺乳類や植物由来のDNA、cDNA等が挙げられるが、特に限定されず、必要に応じて希釈、濃縮、増幅を行う。

【0029】

また、水素結合性を示すレセプター分子30としては、水素結合部位を有し、発蛍光性を示す試薬が望ましい。具体的には、水素結合部位を少なくとも一段、好ましくは複数段有し、ギャップ部位21に隣接する核酸塩基とスタッキングできるような複素環式芳香族基を有する試薬が望ましい。特に水溶性の試薬が好ましいが、非水溶性の場合には有機溶媒を微量用いることにより、対応が可能である。このようなレセプター分子30としては、例えばナフチリジン誘導体、キノリン誘導体、プテリジン誘導体、クマリン誘導体、インダゾール誘導体、アロキサジン誘導体等が挙げられる。

【0030】

なお、上述の例では、遊離した標的核酸10と遊離した検出用核酸20a, 20bとを溶液中で反応させるものとして説明したが、これに限定されるものではない。

【0031】

例えば、図2に模式的に示すように、リンカー分子41を介してレセプター分子30を基板40に固定化し、この基板40上に標的核酸10及び検出用核酸20a, 20bを含む溶液を滴下するようにしても構わない。また、図3に模式的に示すように、リンカー分

子 41 を介して検出用核酸 20a を基板 40 に固定化し、この基板 40 上に標的核酸 10 及び検出用核酸 20b とレセプター分子 30 とを含む溶液を滴下するようにしても構わない。

【0032】

このようにして、レセプター分子 30 又は検出用核酸 20a を基板 40 上に多数集積したマイクロアレイを作製し、遺伝子変異検出用キットとして用いることで、従来の欠点を克服したハイスループットな検出が可能となる。

【0033】

図 2 に示す構成の場合、蛍光強度の変化ではなく、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance; SPR) の信号強度の変化を利用して遺伝子変異を検出することも可能である (例えば文献「Kazuhiko Nakatani, Shinsuke Sando, and Isao Saito, Nat. Biotechnol., 2001, 19, pp.51-55」、文献「Akio Kobori, Souta Horie, Hitoshi Suda, Isao Saito, and Kazuhiko Nakatani, J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, pp.557-562」を参照)。また、図 2 に示す構成の場合、水晶振動子の共振周波数の変化を利用して遺伝子変異を検出することも可能である。

【0034】

以下、遊離した標的核酸 10 と遊離した検出用核酸 20a, 20b とを溶液中で反応させる場合の具体的な実施例について図面を参照しながら詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能であることは勿論である。

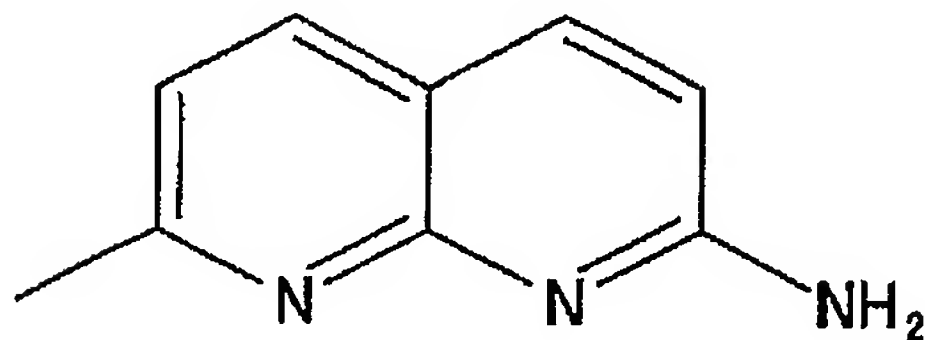
【実施例】

【0035】

以下の実施例では、レセプター分子として、以下の化学式に示すようなナフチリジン誘導体である 2-アミノ-7-メチルナフチリジン (AMND) を用いた。この AMND は、文献「E.V.Brown, J. Org. Chem., Vol.30, p1607, 1965」を参考にして、1, 1-ジメトキシブタノンから合成したものである。

【0036】

【化 1】



【0037】

この AMND は発蛍光性を示し、後述するように、2 種類の検出用 DNA 間のギャップ部位に挿入されたときに標的塩基と相互作用し、標的塩基の違いに基づき蛍光強度が変化するため、蛍光強度を測定することで一塩基置換を検出することができる。

【0038】

ここで、DNA と AMND とを混合する際、AMND は、該 AMND を含有する溶液の形態で混合してもよく、粉末や固形状の形態で混合してもよい。また、蛍光測定は、UV ランプを用いて目視で行ってもよく、蛍光分光器、蛍光顕微鏡、デンシトメーター等の機器を用いてもよい。

【0039】

また、AMNDによる一塩基置換検出の効果を検証するために、以下のような23merの標的DNA（配列a）とそれぞれ11merの2種類の検出用DNA（配列b, c）とをモデル配列として準備した。ここで、配列a中、YはG（グアニン）又はC（シトシン）を示す。

（配列a）5'-TCTCCGCACACYTCTCCCCACAC-3'

（配列b）5'-GTGTGCGGAGA-3'

（配列c）5'-GTGTGGGAGA-3'

具体的に、本実施例では、被検体となる600 μ Mの標的DNA溶液（上記配列a）とそれぞれ600 μ Mの2種類の検出用DNA溶液（上記配列b, c）とをそれぞれ25 μ l、500mM NaCl溶液を50 μ l、5mM EDTAを含む50mM カコジル酸ナトリウム溶液を50 μ l、150 μ M AMND溶液を50 μ l混合し、MilliQ水を加えて全量を250 μ lとした。得られたDNA溶液についてサーマルサイクラーでアニーリング処理を行い、蛍光強度を測定した。蛍光測定には、2mm \times 10mmの蛍光測定用セルを用いた。

【0040】

標的DNAを加えなかった場合（DNA free）の蛍光スペクトルと、標的DNAの標的塩基YがG（グアニン）、C（シトシン）である場合の蛍光スペクトルとを図4に示す。ここで、図4における励起波長は350nmである。図4に示すように、標的塩基YがC（シトシン）である場合に著しく消光している。これは、AMNDがギャップ部位に隣接する核酸塩基とスタッキングし、さらに標的塩基（C）との水素結合形成により安定な会合体を形成しているためと考えられる。このように、消光の有無を検出することで、標的塩基YがG（グアニン）であるかC（シトシン）であるかを知ることができる。

【0041】

同じDNA溶液をプラスチック製の透明チューブに入れ、励起波長350nmのUVランプを用いて蛍光を目視検出した結果を図5に示す。図5には、標的DNA及び検出用DNAのみが含まれた溶液とAMNDのみが含まれた溶液とをそれぞれ透明チューブに入れた場合の蛍光も併せて示す。図5に示すように、標的塩基YがC（シトシン）である場合に著しく消光しており、目視でも確認可能である。

【0042】

以上、具体的な実施例からも分かるように、本実施の形態における遺伝子変異検出方法によれば、連続した1以上の塩基からなる標的塩基11を有する一本鎖の標的核酸10と、この標的塩基11を挟む2種類の部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸20a, 20bとで二本鎖核酸を形成し、この二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプター分子30を添加して標的塩基11と水素結合を形成させ、レセプター分子30と結合した二本鎖核酸の蛍光強度を測定することにより、一塩基置換等の遺伝子変異を効果的に検出することができる。

【0043】

特に、被検体となる標的核酸10のラベル化や熱制御等の煩雑な操作が不要であるため工程数が非常に少なく、また、原理上二本鎖DNA自体の熱的な安定性に依存しないため、検出までの時間が非常に短時間であり、再現性にも優れている。また、UVランプを用いた目視による確認も可能であるため、特別な設備を持たない状況下においても検出が可能である。

【0044】

さらに、レセプター分子30又は検出用核酸20aを基板上に多数集積したマイクロアレイを作製し、遺伝子変異検出用キットとして用いることで、従来の欠点を克服したハイスループットな検出が可能となる。

【0045】

なお、上述した実施の形態では、標的塩基を挟む2種類の部分配列と相補的な2種類の検出用核酸と標的核酸とをハイブリダイゼーションさせることで、意図的にギャップ部位

を導入したが、このギャップ部位は、DNAの修復過程にも生じることが知られている（文献「Erling Seeberg, Lars Eide and Magnar B., Trend. Biochem. Sci., 1995, 20(10), pp.391-397」を参照。）。そこで、図2に示したようにレセプター分子が固定化された基板に二本鎖DNA溶液を滴下して反応させることで、DNAの損傷の有無を検出することも可能である。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】本実施の形態における遺伝子変異検出の原理を説明する図である。

【図2】レセプター分子が基板に固定化されている場合の遺伝子変異検出の原理を説明する図である。

【図3】検出用核酸の一方が基板に固定化されている場合の遺伝子変異検出の原理を説明する図である。

【図4】標的塩基がグアニン、シトシンである場合のAMND添加後の蛍光スペクトルを示す図である。

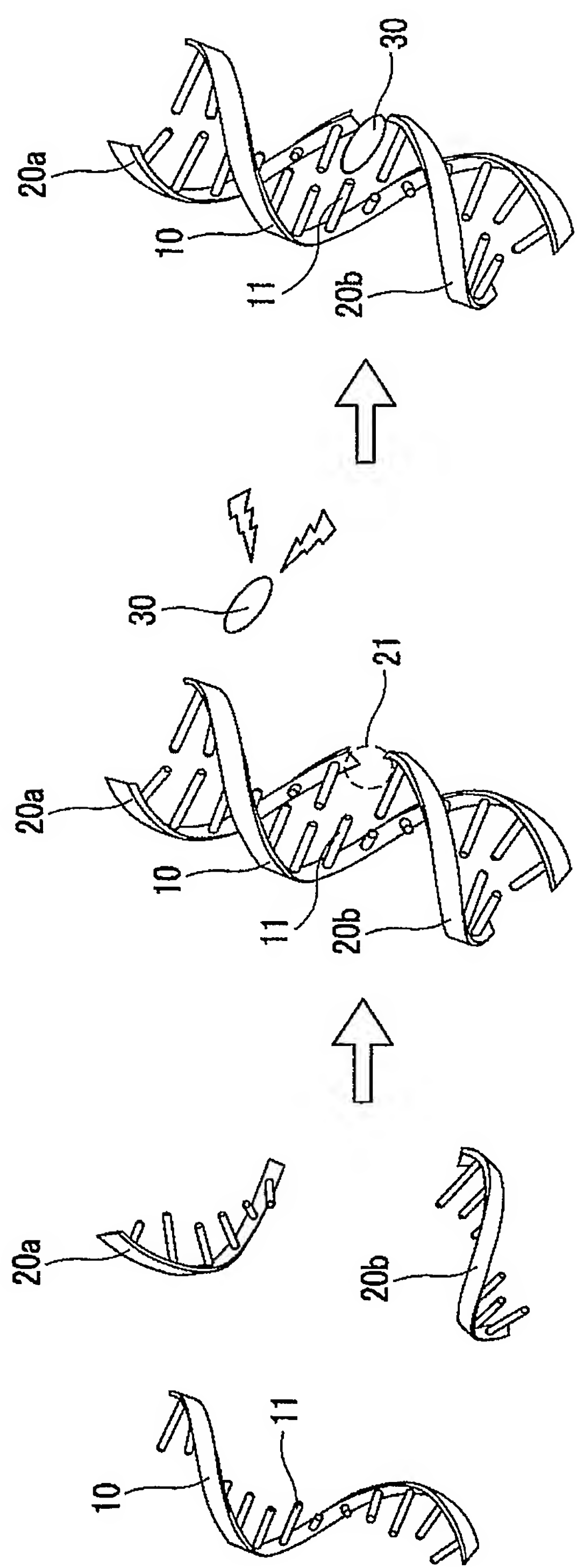
【図5】標的塩基がグアニン、シトシンである場合のAMND添加後の蛍光を示す図である。

【符号の説明】

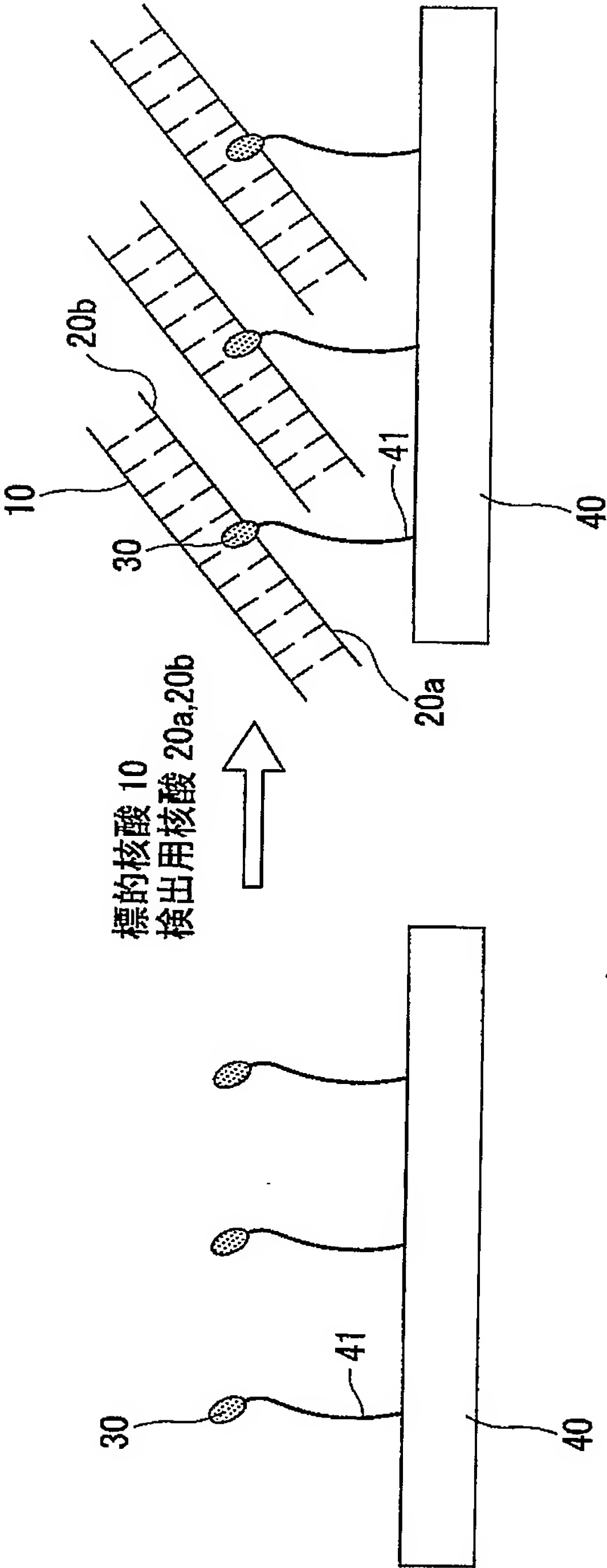
【0047】

10 標的核酸、11 標的塩基、20a, 20b 検出用核酸、21 ギャップ部位、30 レセプター分子、40 基板、41 リンカー分子

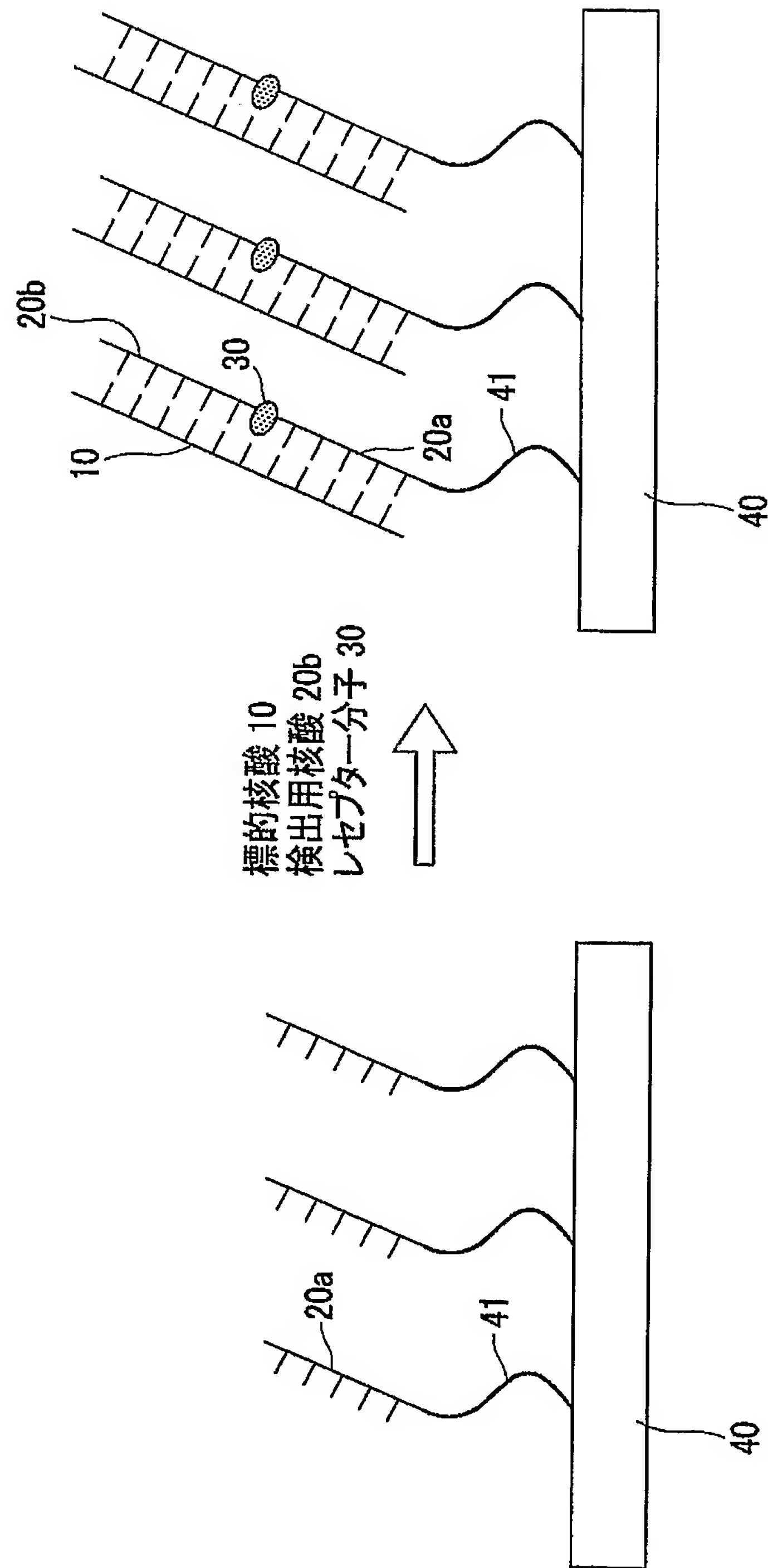
【書類名】 図面
【図 1】



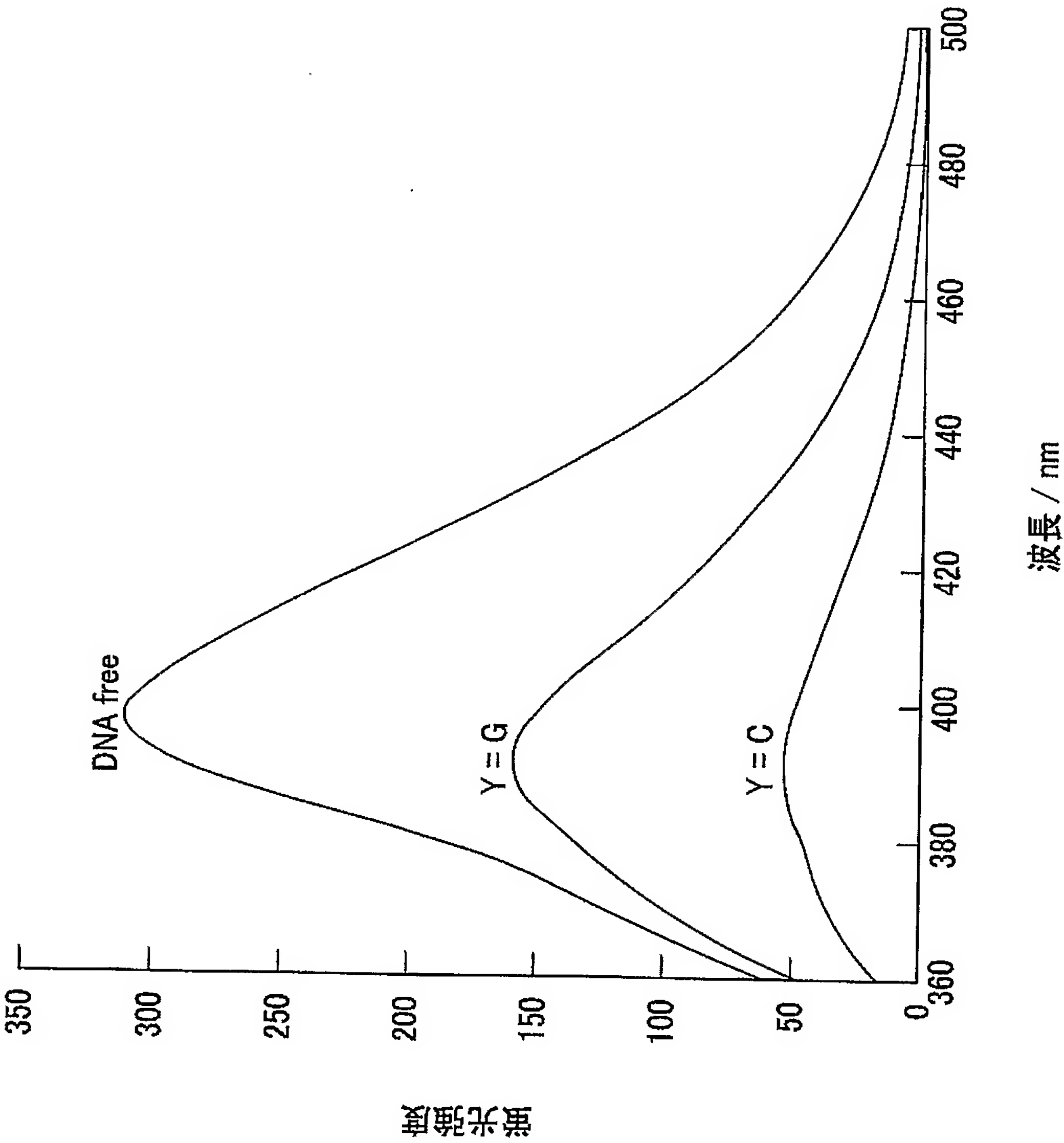
【図 2】



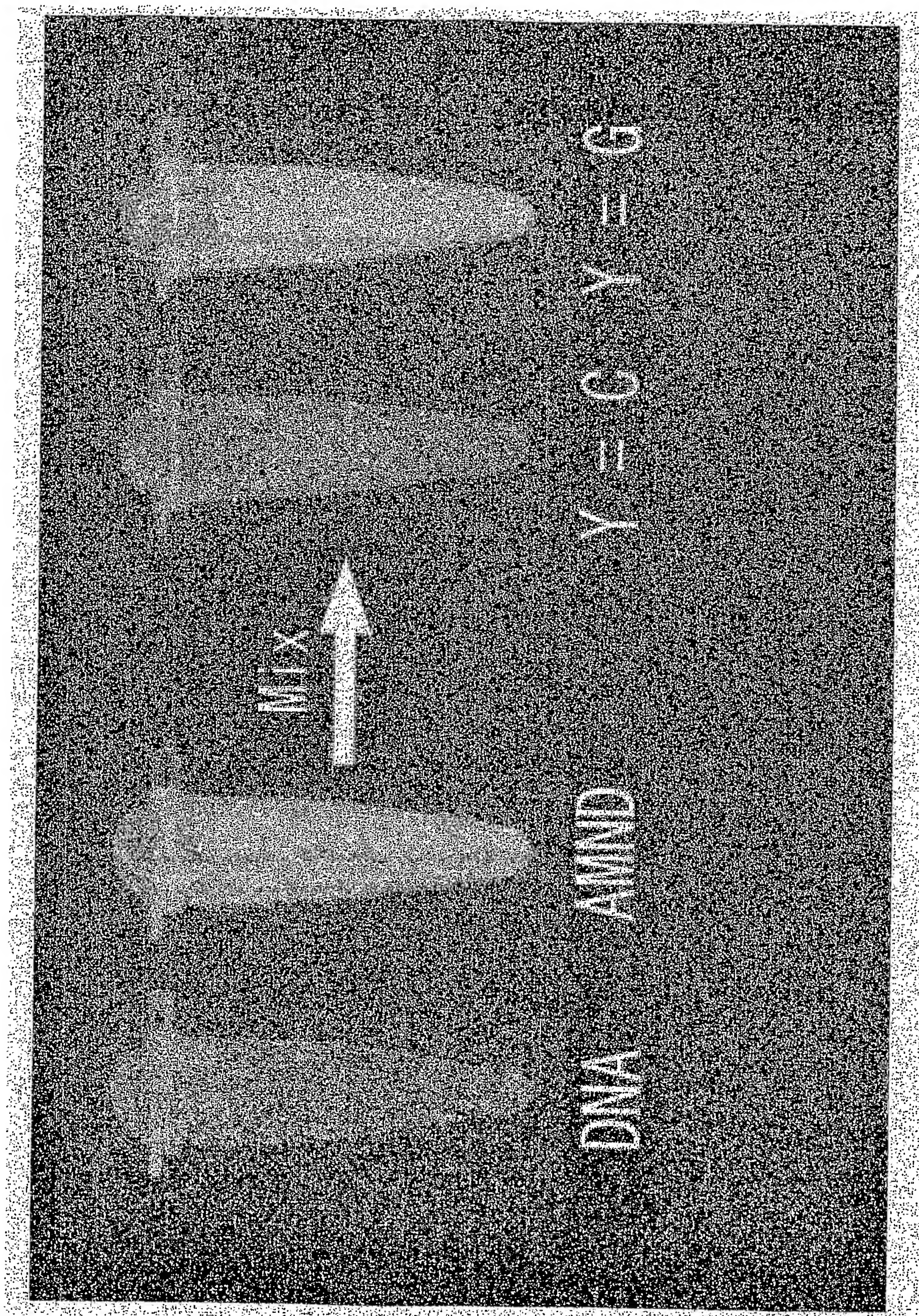
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 標的DNA及び検出用DNAに対する化学修飾を行うことなく、簡便且つ迅速に遺伝子変異を検出する。

【解決手段】 SNP等に関連する標的塩基11を有する一本鎖の標的核酸10を含む溶液と、標的塩基11を挟む部分配列について相補的な2種類の一本鎖の検出用核酸20a, 20bを含む溶液とを混合し、標的核酸10と検出用核酸20a, 20bとをハイブリダイゼーションさせることで、標的塩基11と対向する部位に意図的にギャップ部位21を構築する。そして、疎水場空間であるこのギャップ部位21に水素結合性及び発蛍光性を示すレセプター分子30を挿入する。その後、標的塩基11の違いに基づくレセプター分子30の蛍光強度変化を検出し、一塩基置換を検出する。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 4 - 0 8 0 7 0 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

- | | |
|----------|-----------------------|
| 1. 変更年月日 | 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 独立行政法人 科学技術振興機構 |
| 2. 変更年月日 | 2 0 0 4 年 4 月 1 日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 独立行政法人科学技術振興機構 |